

D. Becker

Berlĳn 1977



Charakterisierung von zwei Klassen temperatur-
sensitiver Transformations Mutanten des Rous
Sarkom Virus

Dorothea Becker

Institut für Virologie, Fachbereich Humanmedizin,
6300 Giessen, Frankfurter Str. 107

Dissertation

vorgelegt dem Fachbereich Biologie der Freien Universität
Berlin

Oktober 1976

1. Referent: Prof. H. Bauer
2. Referent: Prof. A. Graessmann

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Januar 1977



Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

- A. Struktur und Aufbau von RNA Tumoviren
- B. Eigenschaften transformierter Zellen
- C. Überblick über bisherige Ergebnisse
- D. Problemstellung

II. Material

- A. Viren
- B. Zellen
- C. Nährmedien und Chemikalien

III. Methoden

- A. Nachweis für Proteaseaktivität
 - a) im "Agar-Casein-Overlay" Test
 - b) im "¹²⁵J-Fibrin" Test
- B. Gewinnung von Plasminogen-freiem Serum
- C. Anwendung von Plasminogen-freiem Serum in "Weich-Agar" Suspensionskulturen
- D. Tumorbildung in vivo
- E. Rekombinationsversuche



Digitized by the Internet Archive
in 2026

IV. Ergebnisse

- A. Untersuchung der Proteaseaktivität bei Transformationsdefekten Mutanten
- B. Koloniebildung in Suspension bei virusinfizierten Zellen in Abhängigkeit von Plasminogen
- C. Verhalten von Transformationsdefekten Mutanten im Huhn
- D. Lokalisation des genetischen Defekts bei Transformationsdefekten Mutanten

V. Abschließende Betrachtungen

VI. Zusammenfassung

VII. Literaturverzeichnis

VIII. Anhang

I. Einleitung

A. Struktur und Aufbau von RNA Tumroviren

Die Tumroviren bilden innerhalb der animalen Viren keine einheitliche Gruppe. Zu den Tumroviren gehören DNA-haltige (Papova- und Adenoviren) und RNA-haltige Viren. RNA-haltige Viren erzeugen in Tieren verschiedener Spezies wie z. B. in Mäusen, Affen, Katzen oder Hühnern Tumore. Zu den bestuntersuchten RNA Tumroviren gehören neben den Mäuse Leukämie Viren die Hühner Leukose und Sarkom Viren. Während die Hühner Leukose Viren vor allem im hämatopoietischen System Tumore erzeugen, induzieren die Sarkom Viren Fibrosarkome. Im Gegensatz zu den Leukose Viren sind Sarkom Viren in der Lage, Hühnerfibroblasten in vitro zu transformieren. Der bekannteste Vertreter der Sarkom Viren ist das Rous Sarkom Virus. Die Hühner Leukose und Sarkom Viren haben einen Durchmesser von 80 - 120 m μ . Sie sind umgeben von einer äußeren Membran, die von der Wirtszelle während des "budding" Prozesses übernommen wird. Diese äußere Membran ist mit "spikes" besetzt, welche aus Glykoproteinen bestehen und für die Adsorption des Virions an die Wirtszelle notwendig sind.

Das von einer inneren Membran umschlossene Nucleocapsid enthält die virale RNA. Diese virale RNA liegt in Form von doppelsträngiger 60 - 70S RNA vor (MW $6-8 \times 10^6$ d), welche unter denaturierenden Bedingungen in zwei - drei identische Untereinheiten von jeweils 35S RNA mit einem jeweiligen Molekulargewicht von ungefähr 3×10^6 d zerfällt (Beemon et al., 1974; Billeter et al., 1974; ausführliche Daten siehe Kapitel IV. D). Das Genom des RSV codiert für folgende vier Gene: 1) gag, 2) pol, 3) env, 4) sarc (Baltimore, 1974) (Abb. 1). Viruspartikel enthalten ungefähr 2-3% RNA, 60-70% Proteine und 35% Lipide (Beard, 1963). Neben einem Teil der Proteine sind die Lipide wirtszellenspezifische Komponenten.

Einen Überblick über den neusten Stand der genetischen Untersuchungen von RNA Tumoviren wurde zuletzt von Vogt (1976) publiziert.

B. Eigenschaften transformierter Zellen

Nachdem im Jahre 1956 von Manaker und Groupé zum ersten Mal über eine erfolgreiche in vitro Transformation von Hühnerfibroblasten durch das Rous Sarkom Virus (RSV) berichtet wurde, ist es in den folgenden Jahren anhand zahlreicher Parameter gelungen, wichtige Erkenntnisse über die maligne Transformation normaler Zellen zu Tumorzellen zu gewinnen. Im Gegensatz zu normalen Zellen zeigen transformierte Zellen in vitro folgende charakteristische Eigenschaften: 1) keine Wachstumshemmung nach Ausbildung eines einschichtigen Zellrasens (Todaro, Green und Goldberg, 1974). 2) Wachstum in serum-freiem Medium (Smith, Scher und Todaro, 1971). 3) Focus-Bildung unter Agar-haltigem Medium (Temin und Rubin, 1958). 4) Koloniebildung in Weich-Agar- oder Methylcellulose Suspension (Macpherson und Montagnier, 1964; Stoker, 1968). 5) erhöhte Transportrate einiger Zucker (Hatanaka und Hanafusa, 1970; Martin et al., 1971). 6) erhöhte Agglutinierbarkeit durch pflanzliche Lectine (Burger und Martin, 1972). 7) Auftreten neuer Oberflächenantigene (Bauer, 1974); Verlust bestimmter Oberflächenproteine (Ruoslahti und Vaheri, 1974; Hynes, 1976). 8) Freisetzung von Proteasen (Unkeless et al., 1973). 9) Änderung bestimmter Glykoproteine und Glykolipide (Hakamori, 1973). Für eine Charakterisierung in vivo dient die Tumorbildung im Tier (Svoboda, 1960).

C. Überblick über bisherige Ergebnisse

Für eingehende Untersuchungen über die molekularen Vorgänge bei der virus-bedingten Zell-Transformation hat sich die Isolierung von Transformations-defekten Mutanten (Martin, 1970; Kawai und Hanafusa, 1971; Biquard und Vigier, 1971) als sehr wertvoll erwiesen. Basierend auf den Daten meiner Diplomarbeit (1974), die die Isolierung und teilweise Charakterisierung von zwei Klassen temperatur-sensitiver (ts) Transformations-defekter Mutanten des Rous Sarkom Virus behandelte, hat sich gezeigt, daß drei der insgesamt acht isolierten Mutanten im Hinblick auf die unter B) genannten Transformations-Parameter nur partiell defekt sind (PTD), während fünf der acht Mutanten weitgehend (ausgenommen TD 201) die gleichen Eigenschaften zeigen wie zahlreiche in der Literatur beschriebene temperatur-sensitive Transformations-defekte (TD) Mutanten (Wyke und Linial, 1973). Isoliert wurden beide Klassen von temperatur-sensitiven Mutanten mit Hilfe von 5-Bromodeoxyuridin von dem Stamm PRAGUE, Untergruppe A, des Rous Sarkom Virus (PR-RSV-A). Das Studium der partiell Transformations-defekten Mutanten hatte ergeben, daß sich diese in Bezug auf verschiedene Parameter der Transformation in einigen Fällen wie normale Mutanten verhalten, in anderen Fällen

dagegen wie der Wildtyp. Temperatur-sensitives Verhalten zeigten die PTD Mutanten für folgende zwei Parameter:

1) Focus-Bildung unter Agar-haltigem Medium (Focus = Herd transformierter Zellen) 2) gesteigerte Aufnahme von 2-Deoxyglucose. Parameter, bei denen sich die PTD Mutanten wie der Wildtyp verhalten, waren 1) Wachstum in serum-freiem oder serum-haltigen Medium sowie 2) Koloniebildung in einer "Weich-Agar" Suspension. Die Selektion der Mutanten erfolgte auf Grund von Focus-Bildung unter Agar-haltigem Medium bei permissiver (35°C) Temperatur, während der Wildtyp PR-RSV-A bei permissiver und nicht-permissiver (42°C) Temperatur Foci bildete (Becker, Diplomarbeit, 1974).

D. Problemstellung

In Zusammenhang mit vorhergehenden Untersuchungen (Becker, Diplomarbeit, 1974) über das in vitro Verhalten der beiden Klassen von ts Mutanten (TD und PTD), sollten zunächst zwei weitere Parameter der Transformation überprüft werden. Bei diesen beiden Parametern handelte es sich zum einen um den Nachweis einer Proteaseaktivität in transformierten Zellen und zum anderen um eine Plasminogen-abhängige Koloniebildung in Suspension bei Mutanten-infizierten Zellen.

Nachdem Unkeless et al. (1973) nachweisen konnten, daß transformierte Zellen im Gegensatz zu normalen Zellen, eine Protease produzieren, die Plasminogen in Plasmin spaltet, sollten beide Klassen von ts Mutanten auf das Vorhandensein eines "Plasminogen Aktivators" überprüft werden.

Basierend auf diesem Experiment wollten wir versuchen, einen eventuellen Zusammenhang zwischen einer Proteaseaktivität und Koloniebildung in Suspension bei Mutanten-infizierten Zellen nachzuweisen.

Ein weiteres Ziel dieser Untersuchungen sollte es sein, in Zusammenhang mit den Daten früherer Versuche mögliche Korrelationen zwischen den in vitro getesteten Parametern der Transformation aufzuzeigen.

Darüberhinaus interessierte uns die Frage, welche der in vitro untersuchten Parameter der Transformation mit einer Tumorbildung in vivo korrelieren. Zu diesem Zweck wurden die TD bzw. PTD Mutanten im Huhn getestet.

Der Ausgangspunkt weiterer Untersuchungen über den Mechanismus einer virus-bedingten Zelltransformation war die Frage nach der genetischen Lokalisation des phänotypischen Verhaltens bei beiden Klassen von ts Mutanten. Nachdem es verschiedenen Autoren (Duesberg et al., 1975; Stehelin et al., 1976a; Weissmann et al., 1975) gelungen war, die vier bekannten Gene des Virusgenoms (Baltimore, 1974) zu kartieren, wurde es mit Hilfe von Rekombinanten möglich, zwischen ts TD Mutanten und einer nichtconditionellen TD Mutante, welche die Fähigkeit der Transformation verloren hat, den Defekt von TD Mutanten auf einen bestimmten Abschnitt des Virusgenoms, genannt "sarc" zu lokalisieren. (Bernstein et al., 1976).

II. Material

A. Viren

Acht temperatur-sensitive Transformations Mutanten wurden durch Mutagenisierung des Stammes PRAGUE, Untergruppe A, des Rous Sarkom Virus (PR-RSV-A) isoliert. Die bei den Rekombinationsversuchen verwendete nichtconditionell Transformations-defekte Mutante des Stammes PRAGUE, Untergruppe B, (nc TD PR-RSV-B) wurde uns freundlicherweise von Dr. John Wyke, ICRF London, überlassen.

B. Zellen

Hühnerfibroblastenkulturen des Phänotyps C/O (Becker, Diplomarbeit, 1974) (Empfindlichkeit für RSV der Untergruppen A, B, C, D, und E) wurden von Leukosefreien 11-12 Tage alten Hühnerembryonen (Lohmann Tierzucht, Cuxhaven) angelegt. Für die Rekombinationsversuche wurden neben Hühnerfibroblasten der Untergruppe C/O, Hühnerfibroblasten der Untergruppe C/AE (Empfänglich für Viren der Untergruppen B, C, D), verwendet, die wir von Dr. R. Pink, Institut für Immunologie, Basel erhalten hatten.

C. Nährmedien und Chemikalien

Die Kultivierung der Zellkulturen erfolgte in "Eagles-Dulbecco-modified Medium" (EDM) unter Zusatz von 10% Tryptose Phosphat Bouillon (TPB), 5% hitze-inaktiviertem Kälberserum und 0,1% Antibiotika (Streptomycin/Penicillin). "Overlay" Medium bestand zu 50% aus zweifach konzentriertem EDM unter Zusatz von 10% TPB, 5% hitze-inaktiviertem Kälberserum, 1% Glutamin, 0,1% Antibiotika, 6,9% Bicarbonatlösung und zu 50% aus Agar (Bacto Agar, Difco) (Endkonzentration: 0,75%). Das Medium für "Weich-Agar" Suspensions Kulturen bestand zu 50% aus normalen EDM unter Zusatz von 2,5% Hühnerserum und zu 50% aus "Overlay" Medium.

Im "Agar-Casein-Overlay" Test wurde normales "Overlay" Medium verwendet, dem anstelle von Kälberserum 2% Hühner-serum und 1% Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Darmstadt) sowie 2% Trockenmilchlösung (Marvel-Cadbury, Schweppes Food, England) zugesetzt wurden. ¹²⁵Jod wurde von Amersham Buchler, Braunschweig bezogen. Fibrinogen stammte von der Fa. Sigma Chem., München. Das für die Gewinnung von Plasminogen aus Hühnerserum benötigte Harz war Sepharose 4 B (Sigma Chem., München) gekoppelt mit L-Lysin monohydrochlorid (Sigma Chem., München). Cyanogen Bromid wurde von Serva, Heidelberg bezogen. ϵ -Amino-Capron-Säure stammte von Sigma Chem., München.

III. Methoden

A. Nachweis für Proteaseaktivität

a) im "Agar-Casein-Overlay" Test

Der "Agar-Casein-Overlay" Test wurde in der von Goldberg (1974) und Balduzzi und Murphy (1975) beschriebenen Weise durchgeführt. Hühnerfibroblasten wurden mit einer Zellzahl von 1×10^6 /50 mm Platte ausgesät und mit TD bzw. PTD Mutanten infiziert. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei permissiver Temperatur wurden die Zellkulturen zunächst zweimal mit serum-freiem EDM gewaschen und danach mit 2 ml "Agar-Casein-Overlay" Medium pro Platte überschichtet. Das "Agar-Casein-Overlay" Medium bestand aus zweifach konzentriertem EDM unter Zusatz von 10% TPB, 2% Hühnerserum, 1% Glutamin, 0.1% Antibiotika und 2% Trockenmilchlösung. Nach 30 Minuten wurden 5 ml "Agar-Overlay" Medium pro Platte, jedoch ohne Zusatz von Trockenmilchlösung, hinzugegeben. Anschließend wurde ein Teil der Zellkulturen für 2 - 3 Tage bei permissiver und ein Teil bei nicht-permissiver Temperatur inkubiert. Danach zeigten diejenigen virus-infizierten Zellen, die über Proteaseaktivität verfügten, deutlich sichtbare "Plaques." Der beschriebene Versuch kann in der gleichen Weise für "Weich-Agar-Casein" Suspensionskulturen angewendet werden. Zu diesem Zweck

wurden 1×10^6 Zellen pro 50 mm Platte mit jeweils 3 FFU/Zelle infiziert und 24 Stunden bei permissiver Temperatur inkubiert. Die infizierten Zellen wurden danach trypsinisiert und jeweils 2×10^5 Zellen in 2 ml "Weich-Agar" Suspensions Medium unter Zusatz von 2% Trockenmilchlösung aufgenommen und auf einen vorbereiteten "feeder layer" von Wachtelzellen (1×10^6 Zellen/50 mm Platte) gegeben (Friis, 1972). Die Wachtelzellen hatten zuvor "Overlay" Medium (1 ml Medium pro Platte) erhalten. Nach dem Erhärten des "Weich-Agar-Casein-Overlay" Mediums wurden nochmals 3 ml "Weich-Agar" Suspensions Medium ohne Trockenmilchlösung zugegeben. Die Zellkulturen wurden unter den gleichen Bedingungen wie bei der "Agar-Casein-Overlay" Methode inkubiert und nach ungefähr 3 - 4 Tagen auf "Plaque-Bildung" kontrolliert.

b) im "¹²⁵J-Fibrin"Test

¹²⁵J-Fibrin Platten wurden in der von Unkeless et al. (1973) beschriebenen Weise vorbereitet. ¹²⁵Jod wurde mit Hilfe von Chloramin T an Fibrinogen gebunden und mit nicht markiertem Fibrinogen vernetzt. Pro 7 cm² Platte wurden 1.5×10^5 CPM ¹²⁵J-Fibrinogen in 0.1 ml PBS Lösung aufgetragen. Danach wurden die Platten 24 Stunden bei 42°C getrocknet. Die anschließende Zugabe von 5% Plasminogenhaltigem Kälberserum, gelöst in 1 ml EDM, bewirkte die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin (Unkeless et al., 1973).

Wie ebenfalls bei Unkeless et al. (1973) beschrieben, induzieren transformierte Zellen eine Protease, den sogenannten "Plasminogen Aktivator", welche in das Kulturmedium abgegeben wird. Zur Gewinnung des "Plasminogen-Aktivators" wurden Mutanten- bzw. Wildtyp-infizierte Zellen 16 - 18 Stunden in doppeltem Ansatz bei permissiver bzw. nicht-permissiver Temperatur inkubiert. Die Inkubation erfolgte einmal in serum-freiem Medium, im anderen Fall in Medium unter Zusatz von 2.5% Hühnerserum. Die Überstände wurden danach geerntet, zentrifugiert, um Zellrückstände zu entfernen, und bei -70° gefroren. Vor der Zugabe der Proben wurden die ¹²⁵J-Fibrin Platten in serum-freiem

Medium 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend viermal mit serum-freiem Medium gewaschen, um zuvor freigewordene Fibrinpolypeptide zu entfernen. Danach wurde jeweils 1 ml Mediumüberstand pro Platte aufgetragen und 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit wurden im Abstand von 2 Stunden jeweils Proben von 0.1 ml entnommen und die freigewordene Radioaktivität unter Zugabe von Szintillationsflüssigkeit in einem Szintillationszähler gezählt. Da die Proben teilweise in serum-freiem bzw. serum-haltigem Medium inkubiert wurden, erhielt die serumfreie Gruppe von Überständen vor der Inkubation auf den ^{125}J -Fibrin Platten einen Zusatz von 2.5% Hühnerserum, während die zweite Gruppe von (serum-haltigen) Proben ohne weitere Zusätze auf die ^{125}J -Fibrin Platten gegeben wurde. Als Kontrolle für die minimale bzw. maximale Freisetzung von ^{125}J -Fibrin wählten wir EDM ohne Zusätze bzw. unverdünntes Trypsin.

B. Gewinnung von Plasminogen-freiem Serum

Die Gewinnung von Plasminogen-freiem Serum erfolgte nach der von Deutsch und Mertz (1970) beschriebenen Methode der Affinitäts-Chromatographie.

Zunächst wurde Sepharose 4 B mit Cyanogen Bromid (CNBR) aktiviert. Zu diesem Zweck wurden 40 g CNBR in 200 ml H_2O bidest gelöst und zu 400 ml gewaschener Sepharose 4B gegeben und mit 4 N NaOH Lösung auf pH 11 eingestellt. Anschließend wurde die Sepharose 4 B mit 4 Liter 0.1 M $NaHCO_3$ Lösung pH 8.9 über einer Fritte gewaschen und das Sediment in 200 ml derselben Lösung aufgenommen. Zu dieser Suspension wurden dann 40 g L-Lysin monohydrochlorid zugegeben, das zuvor in 200 ml H_2O bidest gelöst und mit 4 N NaOH Lösung auf pH 8.9 eingestellt wurde. Außerdem wurde die Suspension mit 10^7 CPM 3H -Lysin markiert und anschließend für 48 Stunden bei $4^\circ C$ gerührt. Auf diese Weise wurden 44 μmol (Literaturwert: 55 μmol) l-Lysin monohydrochlorid pro ml CNBR-aktivierte Sepharose 4 B gebunden.

Im weiteren Verlauf wurde die 1-Lysin Sepharose 4 B entgast und in eine Säule von 3 x 90 cm gegossen und mit 0.1 M Na Puffer pH 7.4 equilibriert. 200 ml Hühnerserum wurde unter Zusatz von 0.003 M EDTA 1: 188 auf ein Volumen von 400 ml verdünnt. Um Inhibitoren des Plasminogens zu zerstören, wurde das Hühnerserum zunächst Säurebehandelt (Jones et al., 1975), anschließend über die 1-Lysin Sepharose 4 B Säule gegeben und mit 0.1 M Na Puffer pH 7.4 gewaschen, bis die bei 280 nm gemessene Absorption den Wert von 0.01 OD erreicht hatte. Zur Eluierung des Plasminogens, welches konvalent an die α -Aminogruppen des 1-Lysins gebunden sein sollte, wurde 0.2 M ϵ -Aminocapron-Säure pH 7.4 verwendet. ϵ -Aminocapron-Säure inhibiert die Spaltung von Plasminogen in Plasmin. Auf diese Weise wurden ungefähr 200 μ g Plasminogen aus 400 ml Hühnerserum gewonnen. Bevor das Serum ein weiteres Mal über die Säule gegeben wurde, mußte sie mit 6 M Harnstoff gewaschen werden. Alle bisherigen Schritte der Serumreinigung erfolgten bei Zimmertemperatur, so daß die Gefahr der bakteriellen Verunreinigung bestand. Da Bakterien proteolytische Eigenschaften haben, mußte den verwendeten Lösungen einschließlich des Serums 0.1% Antibiotika zugesetzt werden. Um die ϵ -Aminocapron-Säure aus dem Plasminogen zu entfernen, wurde dieses für 24

Stunden bei 4°C gegen 0.005 M Na Puffer pH 7.4 dialysiert. Das Serum wurde steril filtriert und bei -20°C gefroren. Bevor das gereinigte Serum im biologischen Test eingesetzt werden konnte, mußte zunächst gezeigt werden, daß im Serum kein Plasminogen mehr enthalten war. Dieser Nachweis erfolgte mit Hilfe des unter Kapitel A. b) beschriebenen ¹²⁵J-Fibrin Tests. Hierfür wurden 0.1 ml Tris Puffer pH 8.1 unter Zusatz von 0.02 ml Serum und 0.1 ml "Plasminogen Aktivator" gemischt und bei 37°C auf einer ¹²⁵J-Fibrin Platte für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die freigesetzte Radioaktivität einer 100 λ Probe im Szintillationszähler gemessen. Dabei zeigte sich, daß das Hühner Serum nach zweimaliger Reinigung über die L-Lysin Sepharose 4 B Säule kein Plasminogen mehr enthielt.

C. Anwendung von Plasminogen-freiem Serum in "Weich-Agar" Suspensionskulturen

Wie verschiedene Autoren (Pollack et al., 1974; Ossowski et al., 1973) zeigen konnten, besteht bei DNA Tumorviren, wie zum Beispiel SV40, ein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit einer transformationsspezifischen Protease, welche als "Plasminogen Aktivator" bezeichnet wird und der Bildung von Kolonien in einer "Weich-Agar" Suspension. Da die PTD Mutanten bei permissiver und nicht-permissiver Temperatur Kolonien in einer "Weich-Agar" Suspension bilden, (Becker, Diplomarbeit, 1974) schien es von Interesse zu untersuchen, ob für die Koloniebildung der PTD Mutanten Plasminogen notwendig ist. Zu diesem Zweck wurden 1×10^6 Hühnerzellen pro 50 mm Platte mit 2 FFU/Zelle infiziert und für 24 Stunden in EDM unter Zusatz von 10% TPB und 5% Plasminogen-freiem Hühnerserum bei permissiver Temperatur inkubiert, Anschließend wurden die infizierten Zellen trypsinisiert und in verschiedenen Verdünnungen in "Weich-Agar" Suspensions Medium unter Zusatz von 5% Plasminogen-freiem Hühnerserum aufgenommen und auf einen zuvor vorbereiteten Wachtelzellen "feeder layer" gegeben (Friis, 1972). Ein Teil der Suspensionskulturen wurde bei permissiver Temperatur, ein Teil bei nicht-permissiver Temperatur inkubiert. Nach 8 - 10 Tagen

wurden die virus-infizierten Zellkulturen auf Koloniewachstum überprüft. Als Kontrolle für diesen Versuch wurden in dergleichen Weise Suspensionskulturen mit normalem Hühnerserum angesetzt.

D. Tumorbildung in vivo

Zum Nachweis einer Tumorbildung in vivo wurden 21 Tage alte Hühner mit 0.1 ml von 10^2 bzw. 10^3 FFU/Zelle infiziert. Das jeweilige Virus wurde in unterschiedlicher Verdünnung in beide Flügel appliziert. Nach Beobachtung von Bauer (unveröffentlicht) führt die Inokulation verschiedener Virusdosis zu einer unabhängigen Titration. Für jede der zu testenden Mutanten bzw. dem Wildtyp PR-RSV-A wurden jeweils 10 - 12 Tiere infiziert. Die Tiere wurden danach über einen Zeitraum von 35 Tagen zweimal wöchentlich an der Injektionsstelle auf die Bildung von Tumoren kontrolliert. Diejenigen Hühner, die nach einer Dauer von 14 - 21 Tagen nach der Injektion keine Tumore aufwiesen, wurden zur Kontrolle in der zuvor beschriebenen Weise mit Wildtyp Virus der Untergruppe C (PR-RSV-C) nochmals infiziert.

E. Rekombinationsversuche

Zur Überprüfung der Frage, ob beide Klassen von temperatursensitiven Transformations Mutanten einen Defekt im "sarc" Gen aufweisen, mußten zunächst Rekombinanten zwischen den ts Transformations Mutanten und der nc TD Mutante PR-RSV-B gewonnen werden. Zu diesem Zweck wurden Hühnerzellen mit einer Zellzahl von 3×10^6 /100 mm Platte ausgesät und mit jeweils 2 PFU/Zelle infiziert und bei permissiver Temperatur inkubiert. Die virus-infizierten Zellen wurden in einem Abstand von jeweils 3 Tagen zweimal passagiert. Danach wurden die infizierten Zellen trypsinisiert und in Medium aufgenommen. Als nächstes wurde eine Mischinfektion vorgenommen, wobei 1×10^6 Mutanten-infizierte (TD bzw. PTD) Zellen mit jeweils 1×10^6 nc TD PR-RSV-B infizierten Zellen gemischt wurden. Gleichzeitig erfolgte eine Kointinkultivierung von 1×10^6 C/O Zellen, entweder mit 1×10^6 Mutanten- oder 1×10^6 PR-RSV-A, bzw. 1×10^6 PR-RSV-B infizierten Zellen. Nach einer Absorptionsdauer von 20 Min. bei Zimmertemperatur wurden die Zellen auf Petrischalen ausgesät und nach einer 5-tägigen Inkubation bei permissiver Temperatur die Virusüberstände geerntet und bei -70°C gefroren. Danach war zu prüfen, ob die geernteten Virusüberstände bei nicht-permissiver Temperatur Foci bilden.

Zu diesem Zweck wurden 3×10^5 Hühnerzellen pro 30 mm in eine Mediumplatte, unter Zusatz von 2 $\mu\text{g/ml}$ Polybren, ausgesät. Wie Vogt et al. (1969) zeigen konnten, erhöht die Zugabe von Polykationen die Infektivität von RSV der Untergruppen B, C, D um den Faktor 80.

Das gefrorene Virus wurde getaut und für kurze Zeit mit Ultraschall behandelt, um Virusaggregate zu zerstören. Die vorbereiteten Hühnerzellen wurden mit jeweils einer Multiplizität einer Focus-bildenden Einheit pro Zelle [M.O.I. = 1 FFU/Zelle] infiziert. Nach 18 - 24 stündiger Inkubation bei permissiver Temperatur erhielten die infizierten Zellen ein "Overlay" Medium von 3 ml/Platte. 6 - 8 Tage später wurden die bei permissiver Temperatur bzw. bei nicht-permissiver Temperatur inkubierten Zellkulturen auf Focus-Bildung überprüft.

Um zu zeigen, daß es bei dem Vorgang der Mischinfektion zwischen ts Mutanten der Untergruppe A und der nc TD Mutante Untergruppe B zur Entstehung von Rekombinanten des Phänotyps ts TD Untergruppe B gekommen war, wurden die virus-infizierten Zellen im "infectious-center" Test (Weiss et al., 1973) geprüft. Zu diesem Zweck wurden die Hühnerfibroblasten (1×10^6 Zellen/50 mm Platte) mit 2 FFU/Zelle infiziert. Nach 24-stündiger Inkubation

bei permissiver Temperatur wurden die infizierten Zellen für 2 Stunden in EDM unter Zusatz von Mitomycin-C ($10 \mu\text{g/ml}$) bei permissiver Temperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit EDM ohne Zusätze wurden die Zellkulturen nochmals 2 Stunden inkubiert, danach trypsinisiert und in Medium aufgenommen. Als nächstes wurden C/O bzw. C/AE Zellen ($3 \times 10^5/30 \text{ mm}$ Platte) mit den Mitomycin-D behandelten Zellen infiziert und vor der Zugabe von "Overlay" Medium 24 Stunden bei permissiver Temperatur inkubiert. Die Focus-Titer wurden nach einer Inkubationszeit von 6 - 8 Tagen bei permissiver Temperatur ermittelt.

IV. Ergebnisse

A. Untersuchung der Proteaseaktivität bei Transformationsdefekten Mutanten

Zum Nachweis einer Proteaseaktivität in transformierten Zellen wurden die TD bzw. PTD Mutanten zunächst im "Agar-Casein-Overlay" Versuch getestet. Wie schon in Kapitel I. D. erwähnt, handelt es sich bei der nachzuweisenden Protease um den sogenannten "Plasminogen Aktivator" (MW 39 000 d), der Plasminogen in Plasmin spaltet. Dieser Vorgang läßt sich sichtbar machen, indem man einem "Agar-Casein-Overlay" Medium Casein in Form von Trockenmilchlösung zusetzt. Im Fall einer transformations-spezifischen Freisetzung des "Plasminogen Aktivators" wird das Casein lysiert, so daß es zu einer deutlich sichtbaren "Plaque-Bildung" kommt. Zu diesem Zweck wurden normale Zellen mit TD bzw. PTD Mutanten infiziert und nach 24 stündiger Inkubation bei permissiver Temperatur mit einem "Agar-Casein-Overlay" Medium unter Zusatz von 2% Plasminogen-haltigem Hühnerserum überschichtet. Nach einer 2 - 3 tätigen Inkubation bei permissiver bzw. nicht-permissiver Temperatur wurden die virus-infizierten Zellen auf "Plaque-Bildung" überprüft, wobei sich folgendes Ergebnis zeigte (Abb. 2). Während die mit TD Mutanten

infizierten Zellen nur bei permissiver Temperatur "Plaques" induzierten, zeigten die PTD Mutanten-infizierten Zellen bei permissiver und nicht-permissiver Temperatur "Plaque-Bildung". Zellen, die mit Wildtyp Virus infiziert waren, bildeten ebenfalls bei beiden Temperaturen "Plaques". Gleiche Ergebnisse wurden im "Weich-Agar-Casein-Overlay" Versuch erzielt. Sowohl im "Agar-Casein-Overlay" Versuch als auch im "Weich-Agar-Casein-Overlay" Versuch wurde "Plaque-Bildung" innerhalb von 2 - 3 Tagen sichtbar, während Focus- bzw. Kolonie-Bildung erst einige Tage später auftrat.

Im Hinblick auf diese Ergebnisse kann man folgende Aussage machen: Während die TD Mutanten-infizierten Zellen in beiden Experimenten für die Induktion von "Plasminogen-Aktivator" temperatur-sensitiv sind, verhalten sich die PTD Mutanten-infizierten Zellen wie der Wildtyp.

Die beobachtete Proteaseaktivität der PTD Mutanten in den "Agar-Casein-Overlay" Experimenten läßt sich durch die Anwesenheit von Plasminogen im Serum erklären, welches von dem "Plasminogen Aktivator" in Plasmin abgebaut wird. Plasmin ist verantwortlich für die beobachtete Caseinolyse. Da die normalen TD Mutanten unter den gleichen Bedingungen jedoch keine Proteaseaktivität zeigten, sollte versucht

werden, in einem quantitativen Test weitere Aufschlüsse über dieses unterschiedliche Verhalten der beiden Klassen von ts Mutanten zu erhalten.

Die Methode, die sich für diesen Zweck anbot, ist die Methode des "¹²⁵J-Fibrin" Tests. Mit diesem Versuch kann zwischen zwei Proteasen, einer zellgebundenen und einer in den Medium-Überstand abgegebenen, unterschieden werden. Zellgebundener "Plasminogen Aktivator" wurde nachgewiesen, indem PTD Mutanten und TD Mutanten-infizierte Zellen bei 35° und 42°C unter Zusatz von 2.5% Plasminogen-haltigem Hühnerserum inkubiert wurden. Dieses bedeutet, daß sich in den gewonnenen Mediumüberständen neben freigesetztem "Plasminogen Aktivator" hauptsächlich Plasminbefand. Die anschließende 12 stündige Inkubation dieser Überstände auf ¹²⁵J-Fibrin Platten bei 37°C zeigte, daß die PTD Mutanten ts 251 - 253 ähnlich wie in den "Agar-Casein-Overlay" Experimenten nicht defekt sind, während die TD Mutante ts 202 für die zellgebundene Proteaseaktivität temperatur-sensitiv ist (Tabelle 1). Wenn man dagegen PTD Mutanten und TD Mutanten-infizierte Zellen unter serum-freien Bedingungen bei 35° und 42° inkubiert, so enthalten die Mediumüberstände freien "Plasminogen Aktivator".

Setzt man diesen Mediumüberständen 2,5% Hühnerserum als Quelle von Plasminogen zu und inkubiert diese Proben dann auf ^{125}J -Fibrin Platten, so erhält man folgendes Ergebnis: Die PTD Mutanten ts 251 - 253 und die normale TD Mutante ts 202 sind für nicht-zellgebundenen "Plasminogen Aktivator" temperatur-sensitiv (Tabelle 1).

Ein interessantes Verhalten für beide Arten von Protease-aktivität zeigt die TD Mutante ts 201 bei 35° und 42°C . Bei dem Nachweis für zellgebundenen "Plasminogen Aktivator" zeigt TD 201 bei beiden Temperaturen eine ebenso geringe Proteaseaktivität, wie für den Nachweis des freien "Plasminogen Aktivators". Dieses bedeutet, daß die TD Mutante ts 201 für beide Formen der Protease nichtconditionell defekt ist.

B. Koloniebildung in Suspension bei virusinfizierten Zellen in Abhängigkeit von Plasminogen

Als nächstes sollte eine Korrelation zwischen der Anwesenheit von Plasminogen und der Fähigkeit der Koloniebildung untersucht werden. Wie Pollack et al. (1974) zeigen konnten, bilden SV-40 transformierte Ratten Zelllinien nur Kolonien in Suspension, wenn Plasminogen-haltiges Serum in der "Weich-Agar" Suspension enthalten ist. Nach Aussage dieser Autoren ist der "Plasminogen Aktivator" verantwortlich für die Koloniebildung in einer Suspension. Der "Plasminogen Aktivator" ist eine Serin-spezifische Protease mit einem Molekulargewicht von 39 000 d, welche Plasminogen in Plasmin spaltet. Da die PTD Mutanten, wie früher gezeigt (Becker, Diplomarbeit, 1974), im Gegensatz zu den TD Mutanten bei nicht-permissiver Temperatur Kolonien in Suspension bilden, die größer sind als die von PR-RSV-A Wildtyp gebildeten Kolonien, schien es uns wichtig, die obige Aussage für die PTD Mutanten zu überprüfen. Daß sowohl PTD Mutanten-infizierte Zellen wie auch TD Mutanten-infizierte Zellen "Plasminogen Aktivator" induzieren, zeigen die Ergebnisse des "Agar-Casein-Overlay" Experiments und des ¹²⁵J-Fibrin Tests im Kapitel A.

Nachdem wir mit Hilfe der Affinitätschromatographie Plasminogen-freies Hühnerserum gewonnen hatten, wurden beide Klassen von ts Mutanten in "Weich-Agar" Suspension gebracht. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tabelle 2 dargestellt. Stellvertretend für die beiden Klassen von ts Mutanten sind die Ergebnisse für ts TD 202 bzw. ts PTD 253 aufgeführt. Bei den PR-RSV-A infizierten Zellen ist die Kolonie-Bildung in Plasminogen-freiem Serum bei 35° um den Faktor 8 gegenüber der Kolonie-Bildung in Plasminogen-haltigem Serum reduziert. Ein Vergleich bei 42°C zeigt einen zehnfachen Unterschied zwischen der Anzahl der gebildeten Kolonien. Ähnlich ist das Ergebnis im Fall der mit ts PTD 253 infizierten Zellen. Bei permissiver Temperatur ist die Kolonie-Bildung in Plasminogen-freiem Serum um den Faktor 5 gegenüber der Kolonie-Bildung in Plasminogen-haltigem Serum reduziert. Bei nicht-permissiver Temperatur ist die Kolonie-Bildung um den Faktor 3 geringer. Zellen, die mit der Mutante ts TD 202 infiziert wurden, bilden in Plasminogen-freiem Serum nur bei permissiver Temperatur Kolonien. Zusammenfassend kann man sagen, daß sowohl die PTD Mutanten als auch der Wildtyp in der Lage sind, in Abwesenheit von Plasminogen in einer "Weich-Agar" Suspension bei beiden Temperaturen Kolonien zu bilden. Die Anzahl der gebildeten

Kolonien ist jedoch, im Vergleich zu der Anzahl der Kolonien, die in Anwesenheit von Plasminogen gebildet werden, geringer. Im Fall der TD Mutante ts 2o2 werden nur bei permissiver Temperatur in Abwesenheit von Plasminogen Kolonien gebildet. Hinzuzufügen ist, daß die bei permissiver Temperatur gebildeten Kolonien sehr viel kleiner sind als die bei nicht-permissiver Temperatur gebildeten Kolonien.

C. Verhalten von Transformations-defekten Mutanten im Huhn

Nach Aussage von Shin et al. (1975) und Pollack et al. (1975) besteht ein Zusammenhang zwischen der Koloniebildung von SV-40 transformierten 3T3 Zellen in einer "Weich-Agar" Suspension und ihrer Fähigkeit zur Tumorbildung. Da unsere Ergebnisse gezeigt haben, daß die PTD Mutanten im Gegensatz zu den normalen TD Mutanten bei nicht-permissiver Temperatur Kolonien in "Weich-Agar" Suspension bilden, schien es uns wichtig, zu prüfen, ob die Mutanten in der Lage sind, Tumore im Huhn zu induzieren. Die Körpertemperatur des Huhnes ist 42°C, d. h. sie entspricht der nicht-permissiven Temperatur unter in vitro Bedingungen. Wie die in Tabelle 3 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, bildet die PTD Mutante ts 251 in 60% der Tiere Tumore, ts 252 induziert keine Tumore und ts 253 induziert in 10% der Tiere Tumore. Die normale TD Mutante ts 202 bildet in 10% der Fälle Tumore. Die Kontrolle mit PR-RSV-A Wildtyp führt in allen Tieren zur Tumorbildung. Da die injizierte Dosis für beide Klassen von ts Mutanten um den Faktor 10 höher war als diejenige Dosis, die nötig war, um in 100% der Tiere Tumore mit Wildtyp Virus zu erzeugen, kann man sagen, daß PTD und TD Mutanten in vivo nicht onkogen sind.

D. Lokalisation des genetischen Defekts bei Transformations-defekten Mutanten

Während der letzten zwei Jahre ist es verschiedenen Arbeitsgruppen gelungen, das Genom des Rous Sarkom Virus zu kartieren. Virale 60-70S RNA des Rous Sarkom Virus hat ein Molekulargewicht von $6-8 \times 10^6$ d. Unter denaturierenden Bedingungen zerfällt die 60-70S RNA in zwei identische Untereinheiten von jeweils 35S mit einem Molekulargewicht von ungefähr 3×10^6 d. (Beemon et al., 1974; Billeter et al., 1974). Unter der Voraussetzung, daß jede der beiden 35S Untereinheiten das komplette Virusgenom darstellt, läßt sich mit Hilfe experimenteller Daten eine Anordnung der vier bekannten Gene des Rous Sarkom Virus (Baltimore, 1974) vornehmen (Abb. 1). Es konnte weiterhin gezeigt werden, (Duesberg et al., 1970), daß nichtconditionell Transformations-defekte Mutanten im Gegensatz zu parentalen Rous Sarkom Viren bzw. temperatur-sensitiven Transformations Mutanten auf Grund einer Deletion nicht mehr über die "sarc" spezifische Sequenz verfügen. Anhand dieser Daten ist es möglich geworden, mit Hilfe von Rekombination zwischen einer nc TD Mutante und einer ts TD Mutante zuzeigen, daß der Defekt der ts

Mutante im "sarc" Gen lokalisiert ist.

Um zu prüfen, ob dieses auch für die hier beschriebenen beiden Klassen von temperatur-sensitiven Transformations (TD bzw. PTD) Mutanten zutrifft, wurden zunächst Rekombinanten zwischen partiell-transformations-defekten Mutanten und einer nc TD Mutante bzw. zwischen TD Mutanten und einer nc TD Mutante hergestellt. Wie die Ergebnisse des anschließenden Focus-Tests (Tabelle 4) zeigen, kommt es bei 42°C zu keiner Focus-Bildung, d. h. es werden keine Rekombinanten gebildet, die sich wie parentales Virus verhalten. Eine Kontrolle, daß Rekombinanten zwischen beiden Klassen von ts Mutanten und der nc TD Mutante stattgefunden hatte, bildete der "infectious-center" Test (Weiss et al., 1973). Eine signifikante Menge an Virusnachkommenschaft wurde gebildet, die in der Lage war, die C/AE Zellen zu transformieren. Mit anderen Worten, beide Klassen von ts Mutanten (TD bzw. PTD), die zuvor der Untergruppe A angehörten, hatten auf Grund von Rekombination mit einer nc TD Mutante der Untergruppe B, Hüllantigene der Untergruppe B erhalten, so daß die C/AE Zellen infiziert werden konnten. Diese Versuche zeigen, daß für das transformationsspezifische "sarc" Gen keine Rekombination stattfindet, da die nc TD Mutante über dieses Gen nicht verfügt und sowohl die PTD als auch die TD Mutanten im "sarc" Gen defekt sind.

V. Abschließende Betrachtungen

In vorliegender Arbeit sollte versucht werden, einen Überblick über das Verhalten von zwei Klassen temperatur-sensitiver Transformations Mutanten des Rous Sarkom Virus zu geben. Während sich die TD Mutanten in allen Untersuchungen temperatur-sensitiv verhalten, zeigen die PTD Mutanten ts 251 - 253 temperatur-sensitives Verhalten für die Parameter: Focusbildung, erhöhte Zuckeraufnahme, und freien "Plasminogen Aktivator". Beim Nachweis für die Kolonie-Bildung in einer "Weich-Agar" Suspension, dem Wachstum in Medium mit oder ohne Serum-Zusatz und dem Auftreten von zellgebundenem "Plasminogen Aktivator" verhalten sich die PTD Mutanten wie der Wildtyp PR-RSV-A. Einen Überblick über das unterschiedliche Verhalten der beiden Klassen von ts Mutanten gibt die Tabelle 5.

Wie zu Beginn aufgeführt, sind zwei weitere Parameter charakteristisch für die virus-bedingte Transformation von Zellen. Diese Parameter sind das Verschwinden des LETS Proteins (large external transformation sensitive; Glykoprotein von 250000 d) und eine erhöhte Agglutinierbarkeit durch Concanavalin A. In Zusammenarbeit mit Dr. R. Kurth und Dr. D. Critchley am Imperial Cancer Research Fund Laboratory in London, konnten wir zeigen,

daß die PTD Mutanten und die TD Mutanten für diese beiden Parameter temperatur-sensitiv sind.

Im Hinblick auf das Verschwinden des LETS Proteins zeigt die TD Mutante ts 201, ebenso wie beim Nachweis der beiden Proteaseaktivitäten, ein interessantes Verhalten. TD 201, welche für die meisten Parameter der Transformation temperatur-sensitiv ist, zeigt bei permissiver Temperatur kein Verschwinden des LETS Proteins. Weiterhin hat sich gezeigt, daß TD 201 geringe Proteaseaktivität für zellgebundenen und freien "Plasminogen Aktivator" exprimiert. Man kann also sagen, daß die Mutante TD 201 für die Parameter: Focusbildung, erhöhte Hexose Aufnahme, Wachstum in Medium mit oder ohne Serum, Kolonie-Bildung in Suspension, Tumorbildung im Tier und Agglutinierbarkeit durch pflanzliche Lectine temperatur-sensitives Verhalten zeigt; jedoch für das Verschwinden des LETS Proteins bzw. der Freisetzung von "Plasminogen Aktivator" sich wie eine nichtconditionell defekte Mutante verhält.

Wie schon in der Einleitung erwähnt, waren wir unter anderem daran interessiert, eine Korrelation zwischen verschiedenen Parametern der Transformation aufzuzeigen.

Wie von Hynes et al (1974) und Yamada et al. (1976) angenommen, hat das LETS Protein einen Einfluß auf das Wachstum von Zellen in Abhängigkeit von der Zelldichte. Das Verhalten der PTD Mutanten-infizierten Zellen bei nicht-permissiver Temperatur hat jedoch gezeigt, daß das LETS Protein vorhanden ist, obwohl die Zellen nicht Wachstumsinhibiert sind. Nach Hynes et al. (1975) könnte der intransformierten Zellen vorkommende "Plasminogen Aktivator" einen Einfluß auf die Abwesenheit des LETS Proteins in transformierten Zellen haben. Da jedoch die PTD Mutanten bei nicht-permissiver Temperatur zellgebundenen "Plasminogen Aktivator" exprimieren, und gleichzeitig LETS Protein vorhanden ist, können wir diese Aussage nicht bestätigen. Vielmehr müssen wir annehmen, daß der "Plasminogen Aktivator" mit dem Verschwinden des LETS Proteins nichts zu tun hat. Wie schon in Kapitel B und C aufgeführt, zeigt das Studium der PTD Mutanten, im Gegensatz zu den Untersuchungen von Shin et al. (1974), daß keine Korrelation zwischen der Koloniebildung in einer "Weich-Agar" Suspension und der Tumorbildung in vivo besteht. Außerdem können wir sagen, daß die untersuchten Parameter, die unter in vitro Bedingungen charakteristisch für die Transformation einer Zelle sind, in vivo nicht ausreichen, um eine Tumorbildung hervorzurufen.

Weiterhin hat das Studium der PTD Mutanten gezeigt, daß nicht wie von Pollack et al. (1974) beschrieben, eine Korrelation zwischen der Anwesenheit von Plasminogen und der Koloniebildung in einer "Weich-Agar" Suspension besteht. Die in Tabelle 2 aufgeführten Ergebnisse zeigen, daß die Mutante PTD 253 bei permissiver und nicht-permissiver Temperatur in Abwesenheit von Plasminogen Kolonien bildet.

In vorhergehenden Versuchen (Becker, Diplomarbeit, 1974) konnten wir nachweisen, daß die TD Mutanten in Plasminogen-haltigem Kälberserum nur bei permissiver Temperatur Kolonien in Suspension bilden. Setzt man jedoch einer "Weich-Agar" Suspension anstelle von Plasminogen-haltigem Kälberserum Plasminogen-haltiges Hühnerserum zu, so werden sowohl bei permissiver als auch bei nicht-permissiver Temperatur Kolonien gebildet (Tab. 2). Diese Beobachtung läßt sich möglicherweise dadurch erklären, daß in Kälberserum Inhibitoren enthalten sind, die im Fall der TD Mutanten eine Koloniebildung verhindern.

Das Studium der PTD Mutanten hat gezeigt, daß diese Mutanten in Bezug auf verschiedene Parameter der Transformation intermediäres Verhalten exprimieren, d. h. daß eine virusbedingte in vitro Transformation von Zellen nicht als ein Alles-oder-Nichts Effekt angesehen werden kann. Ein ähnliches

intermediäres Verhalten wie das der PTD Mutanten wurde für Mäuse 3T3 Zelllinien, welche mit einer thermosensitiven Mutante des Polyoma Virus infiziert waren, von Okada et al. (1975) beschrieben. Untersuchungen von Risser et al. (1974) haben ebenfalls gezeigt, daß Klone von SV-40 transformierten Mäuse 3T3 Zellen sich in Bezug auf verschiedene Parameter der Transformation unterschiedlich verhalten.

Um die Existenz von PTD bzw. TD Mutanten zu erklären, kann man folgende Überlegungen anstellen: Wenn man annimmt, daß das "sarc" Gen des Rous Sarkom Virus Genoms für ein transformations-spezifisches Protein kodiert, stellt sich die Frage nach der Wechselwirkung dieses Proteins mit der Wirtszelle. Für diesen Mechanismus bieten sich zwei Modelle an: a) Das Protein hat eine einzige aktive Stelle, von der aus nacheinander verschiedene zelluläre Funktionen beeinflusst werden oder b) das Protein hat mehrere aktive Stellen, von denen unabhängig voneinander verschiedene Funktionen der Wirtszelle beeinflusst werden. Nimmt man an, daß die Möglichkeit a) zutrifft, dann ließe sich die Existenz der PTD Mutanten dadurch erklären, daß auf Grund einer Konformationsveränderung des transformationsspezifischen Proteins verschiedene Wechselwirkungen mit der Wirtszelle nicht mehr

stattfinden können, während einige nicht betroffen sind. Mit anderen Worten, wenn man annimmt, daß im Fall des Wildtyp Virus 1 000 Moleküle nötig sind um eine Zelle zu transformieren, dann würden im Fall der PTD Mutanten vielleicht 900 Moleküle nicht mehr synthetisiert, während 100 Moleküle noch vorhanden wären, die eine partielle Transformation der Wirtszelle bewirken. Im Fall der TD Mutanten könnte die Konformation des Proteins durch eine Mutation völlig verändert sein, so daß sämtliche Wechselwirkungen mit der Wirtszelle ausgeschaltet sind. Die Möglichkeit b) würde bedeuten, daß im Fall der PTD Mutanten einige der aktiven Stelle des transformations-spezifischen Proteins durch Mutation ausgeschaltet sind, während andere Stellen dagegen nicht beeinträchtigt sind und somit weiterhin verschiedene Funktionen der Wirtszelle beeinflußt werden können. In Bezug auf die TD Mutanten könnte eine Mutation die gesamte Konformation des Proteins verändert haben. Unsere künftige Aufgabe wird es sein, mit Hilfe der PTD Mutanten und TD Mutanten weitere Hinweise zu erhalten, die es ermöglichen, zwischen den genannten Alternativen zu unterscheiden.

VI. Zusammenfassung

Das Studium von acht temperatur-sensitiven Transformations Mutanten des Rous Sarkom Virus hat gezeigt, daß drei Mutanten sich im Hinblick auf verschiedene Parameter der Transformation partiell defekt verhalten. Fünf dieser Mutanten TD GI ts 201, ts 202, ts 203, ts 204, ts 205, verhalten sich wie normale temperatur-sensitive Transformations Mutanten. Die PTD Mutanten GI ts 251, ts 252, ts 253 sind temperatur-sensitiv für Focus-Bildung, erhöhte Hexose-Aufnahme, Tumorbildung in vivo, Agglutinierbarkeit von Concanavalin A und das Verschwinden eines 250 000 Dalton Oberflächenproteins (LETS). Für die Parameter des Wachstums in Medium, der Koloniebildung in einer "Weich-Agar" Suspension und nicht-zellgebundener Proteaseaktivität verhalten sich die PTD Mutanten wie der Wildtyp PRAGUE-A des Rous Sarkom Virus. Rekombinationsversuche zwischen TD bzw. PTD Mutanten mit einer nc TD Mutante (nc TD PR-RSV-B) hat gezeigt, daß TD bzw. PTD Mutanten einen Defekt im "sarc" Gen haben.

VII. Literaturverzeichnis

1. Balduzzi, P. C., and H. Murphy. 1975.
Plaque assay of avian sarcoma viruses using casein.
J. Virol. 16: 707
2. Baltimore, D. 1974.
Tumor viruses: 1974.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39: 1187
3. Bauer, H. 1974.
Virion and tumor cell antigens of C-type RNA tumor viruses.
Adv. Cancer Res. 20: 275
4. Beard, J. W. 1963.
Avian virus growths and ethiologic agents.
Adv. Cancer Res. 7: 1
5. Beemon, K. L., P. H. Duesberg, and P. K. Vogt. 1974.
Evidence for crossing-over between avian tumor viruses
based on analysis of viral RNAs.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71: 4254

6. Becker, D. 1974.

Genetische Untersuchungen über die maligne Transformation
von Hühnerzellen.

Diplomarbeit , Fachbereich Biologie (23), Freie Universität Berlin

7. Bernstein, A., R. MacCormick, and G. S. Martin. 1976.

Transformation-defective mutants of avian sarcoma viruses:
The genetic relationship between conditional and non-
conditional mutants.

Virology 70: 206

8. Billeter, M. A., J. T. Parsons, and J. M. Coffin. 1974.

The nucleotide sequence complexity of avian tumor virus RNA.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71: 3560

9. Biquard, J.-M., and P. Vigier. 1971.

Isolement et étude d'un mutant conditionnel du virus de
Rous a capacité transformante thermosensible.

Compt. Rend. Acad. Sci. D. 271: 2430

10. Burger, M. M., and G. S. Martin. 1972.

Agglutination of cells transformed by Rous sarcoma virus
by wheat germ agglutinin and concanavalin A.

Nature (London) New Biol. 237: 9

11. Deutsch, D. G., and E. T. Mertz. 1970.

Plasminogen purification from human plasma by affinity chromatography.

Science 170: 1095

12. Duesberg, P. H., and P. K. Vogt. 1970 .

Differences between the ribonucleic acids of transforming and nontransforming avian tumor viruses.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 67: 1673

13. Duesberg, P. H., S. Kawai, L. Wang, P. K. Vogt, H. M. Murphy, and H. Hanafusa. 1975.

RNA of replication-defective strains of Rous sarcoma virus.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72: 1569

14. Friis, R. R. 1972.

Abortive infection of Japanese quail cells with avian sarcoma viruses.

Virology 50: 701

15. Goldberg, A. R. 1974.

Increased protease levels in transformed cells: a casein overlay assay for detection of plasminogen activator production.

Cell 2: 95

16. Hatanaka, M., and H. Hanafusa. 1970.

Analysis of a functional change in membrane in the process of cell transformation by Rous sarcoma virus. Alteration in the characteristics of sugar transport. Virology 41: 647

17. Hakamori, S. J. 1973.

Glycolipids of tumor cell membranes. Adv. Cancer Res. 18: 265

18. Hynes, R. O. 1976.

Cell surface proteins and malignant transformation. BEA 458: 73

19. Hynes, R. O., and J. M. Bye. 1974.

Density and cell cycle dependence of cell surface proteins in hamster fibroblasts. Cell 3: 113

20. Hynes, R. O., J. A. Wyke, K. C. Humphrys, and E. S. Pearlstein. 1975.

Are proteases involved in altering cell surface proteins during viral transformation?

In "Proteases and Biological Control" (E. Reich, E. Shaw, and D. B. Rifkin, eds.) Cold Spring Harbor New York: 931

21. Jones, P. A., W. F. Benedict, S. Strickland, and E. Reich. 1971.
Fibrin overlay methods for the detection of single
transformed cells and colonies of transformed cells.
Cell 5: 323
22. Kawai, S., and H. Hanafusa. 1971.
The effects of reciprocal changes in temperature in the
transformed state of cells infected with a Rous sarcoma
virus mutant.
Virology 46: 470
23. Macpherson, I., and L. Montagnier. 1964.
Agar suspension for the selective assay of cells
transformed by polyoma virus.
Virology 23: 291
24. Manaker, R. A., and V. Groupé. 1956
Discrete foci of altered embryo cells associated
with Rous sarcoma virus in tissue culture.
Virology 2: 838

25. Martin, G. S. 1970.

Rous sarcoma virus: A function required for maintenance of the transformed state.

Nature 227: 1021

26. Martin, G. S., S. Venuta, J. M. Weber, and H. Rubin. 1971.

Temperature-dependent alteration in sugar transport in cells infected by a temperature-sensitive mutant of Rous sarcoma virus.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68: 2739

27. Okada, J. S., and H. Hakura. 1975.

Temperature-dependent properties of cells transformed by a thermosensitive mutant (ts-121) of polyoma virus.

II. characterization of 121-6 cells.

Int. J. Cancer 16: 394

28. Ossowski, L., J. P. Quigley, G. M. Kellerman, and E. Reich. 1973.

Fibrinolysis associated with oncogenic transformation. Requirement of Plasminogen for correlated changes in cellular morphology, colony formation in agar, and cell migration.

J. Exp. Med. 138: 1056

29. Pollack, R. E., and D. Rifkin. 1975.

Actin-containing cables within anchorage-dependent rat embryo cells are dissolved by plasmin and trypsin.

Cell 6: 495

30. Pollack, R. E., and R. Risser, and D. Rifkin. 1974.

Plasminogen activator production accompanies loss of anchorage regulation intratransformation of primary rat embryo cells by Simian virus 40.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71: 4792

31. Risser, R., and R.E. Pollack. 1974.

A nonselective analysis of SV-40 transformation of mouse 3T3 cells.

Virology 59: 477

32. Ruoslahti, E., and A.Vaheri. 1974.

Novel human serum protein from fibroblast plasma membrane.

Nature (London) 248: 789

33. Shin, S. I., V.H. Freedman, R. Risser, and R.E. Pollack. 1975.

Tumorigenicity of virus-transformed cells in nude mice is correlated specifically with anchorage independent growth in vitro.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72: 4435

34. Smith, H., C. Scher, and G. Todaro. 1971.

Induction of cell division in medium lacking serum growth factor by SV-40.

Virology 44: 359

35. Stehelin, D., R. V. Guntaka, H. E. Varmus, and J. M. Bishop. 1976 a.

Purification of DNA complementary to nucleotide sequences required for neoplastic transformation of fibroblasts by avian sarcoma viruses.

J. Mol. Biol. 101: 349

36. Stoker, M. 1968.

Abortive transformation by polyoma virus.

Nature (London) 218: 234

37. Svoboda, J. 1960.

Presence of chicken tumor virus in the sarcoma of the adult rat inoculated after birth with Rous sarcoma virus.

Nature (London) 186: 980

38. Temin, H. M., and G. Rubin. 1958.

Characteristics of an assay for Rous sarcoma virus and
Rous sarcoma cells in tissue culture.

Virology 6: 669

39. Todaro, G. J., H. Green, and B. J. Goldberg. 1964.

Transformation of properties of an established
cell line by SV-40 and polyoma virus.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 51: 66

40. Unkeless, J. C., A. Tobia, L. Ossowski, J. P. Quigley,
D. Rifkin, and E. Reich. 1973.

An enzymatic function associated with transformation of
fibroblasts by oncogenic viruses. I. Chick embryo fibroblast
cultures transformed by avian RNA tumor viruses.

J. Exp. Med. 137: 85

41. Vogt, P. K., K. Toyoshima, and S. Yoshii. 1969.

Factors promoting avian tumor virus infections.

2nd Int. Symp. on Tumor viruses 183: 230

42. Weiss, R.A., W.S. Mason, and P. K. Vogt. 1973.
Genetic recombinants and heterozygotes derived
from endogenous and exogenous avian RNA tumor
viruses.
Virology 52: 535
43. Weissmann, C., J. T. Parsons, J. W. Coffin,
L. Rymo, M. A. Billeter, and H. Hofstetter. 1975.
Studies on the structure and synthesis of Rous sarcoma
virus RNA.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39: 1043
44. Wyke, J. A., and M. Linial. 1973.
Temperature sensitive avian sarcoma viruses.
A physiological comparison of twenty mutants.
Virology 53: 152
45. Yamada, K. M., S. S. Yamada, and I. Pastan. 1976.
Cell surface protein partially restores morphology,
adhesiveness, and contact inhibition of movement of
transformed fibroblasts.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 73: 1217

Tabelle 1

Proteaseaktivität in virus-infizierten Hühnerfibroblasten

Virus	Freigesetztes ^{125}J -Fibrin in CPM ^a /Menge in ml von eingesetztem Mediumüberstand			
	Zellgebundener "Plasminogen Aktivator"		"Plasminogen Aktivator" im Mediumüberstand	
	35°	42°	35°	42°
normale Zellen	630	260	330	380
wt PR-RSV-A	31800	27600	13500	10900
ts PTD 251	29100	24800	15100	660
ts PTD 252	27200	21800	13000	550
ts PTD 253	27900	23600	12500	400
ts TD 201	2200	900	690	360
ts TD 202	24000	460	11100	640

^a CPM = Radioaktiver Zerfall pro Minute

Die Bestimmung der Proteaseaktivität für zellgebundenen "Plasminogen Aktivator" bzw. freien (im Mediumüberstand) "Plasminogen Aktivator" erfolgte nach der in Kapitel A.b) beschriebenen Methode,

Tabelle 2

Koloniebildung in Suspension in Abhängigkeit von Plasminogen

Anzahl der gebildeten Kolonien/ 1×10^5 Zellen in Suspension

Virus	Serum			
	^a Plasminogen-frei		Plasminogen-haltig	
	35°	42°	35°	42°
wt PR-RSV-A	15	40	120	400
ts TD 202	12	0	80	100
ts PTD 253	10	130	50	400
normale Zellen	0	0	0	0

^a Die Gewinnung von Plasminogen-freiem Hühnerserum erfolgte nach der von Deutsch und Mertz (1970) beschriebenen Methode (siehe Kapitel III.B.)

Tabelle 3

Tumorbildung im Huhn (Körpertemperatur 42°C)

Virus	Dosis FFU ^a	Tumor positive Tiere / Anzahl infizierter Tiere			
		nach: 14 Tagen	21 Tagen	28 Tagen	35 Tagen
wt PR-RSV-A	10 ²	8/10	10/10	3/3	3/3
	10 ³	10/10	10/10	2/2	2/2
ts TD 202	10 ³	0/9	0/9	0/9	0/9
	10 ⁴	1/9	1/9	1/9	1/9
ts PTD 251	10 ³	0/10	0/10	0/10	0/10
	10 ⁴	5/10	6/10	4/8	4/8
ts PTD 252	10 ³	0/9	0/9	0/8	0/8
	10 ⁴	0/9	0/9	0/8	0/8
ts PTD 253	10 ³	0/12	0/12	0/12	0/12
	10 ⁴	1/12	1/12	1/12	1/12

^a Focus forming units

3 Wochen alte Hühner wurden jeweils in Gruppen von 9 - 12 Tieren mit den jeweiligen Viren infiziert. Jedes der Tiere wurde mit 0.1 ml Virus der angegebenen Dosis inokuliert. In den linken Flügel wurde eine 10-fach höhere Dosis als in den rechten Flügel appliziert; so daß eine unabhängige Titration mit zwei verschiedenen Verdünnungen in einer geringen Anzahl von Tieren vorgenommen werden konnte.

Die Tiere wurden zweimal wöchentlich auf Tumorbildung untersucht.

Tabelle 4

Rekombinantenbildung zwischen einer nc TD Mutante und
ts TD bzw. ts PTD Mutanten

Virus	Focus-Titer der Virusnachkommenschaft bei 42°C ^a	Focus-Titer der Virus- nachkommenschaft mit der Untergruppe B bei 35°C ^b
wt PR-RSV-A	1×10^0	$< 10^{-3}$
wt PR-RSV-B	1×10^0	8.3×10^{-3}
nc TD PR-RSV-B	$< 10^{-3}$	$< 10^{-3}$
ts PTD 251	5.0×10^{-2}	$< 10^{-3}$
ts PTD 253	6.0×10^{-2}	$< 10^{-3}$
ts TD 2o1	3.0×10^{-2}	$< 10^{-3}$
ts TD 2o2	1.2×10^{-2}	$< 10^{-3}$
ts PTD 251 x nc TD PR-RSV-B	8.0×10^{-2}	4.0×10^{-1}
ts PTD 253 x nc TD PR-RSV-B	3.0×10^{-2}	5.0×10^{-1}
ts TD 2o1 x nc TD PR-RSV-B	1.6×10^{-1}	2.8×10^{-1}
ts TD 2o2 x nc TD PR-RSV-B	1.2×10^{-1}	2.9×10^{-2}

^a Focus-Titer bei 42°C dividiert durch den Focus-Titer bei 35°C.

^b Focus-Titer bei 35°C von Rekombinanten auf C/AE Zellen dividiert durch den Focus-Titer bei 35°C von Rekombinanten auf C/O Zellen.

Tabelle 5

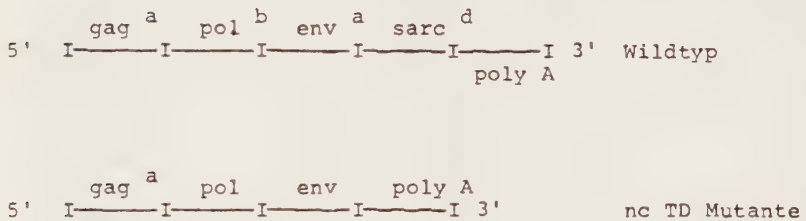
Übersicht über das Verhalten der PTD und TD Mutanten bei nicht-permissiver Temperatur (42°C)

Virus	Focus-Bildung	erhöhte Hexoseaufnahme	Agglutination durch Con A	Ver-schwinden des LETS Proteins	Tumor-bildung in vivo	Freier Plasminogen Aktivator	Zell-gebundener Plasminogen Aktivator	Kolonie-bildung in Suspension, minogen - Wachstum, minogen - freier in serum - Suspension Medium
unifizierte Zellen	-	-	-	-	-	-	-	-
wt PR-RSV-A	+	+	+	+	+	+	+	+
ts PTD 251	-	-	-	-	-	-	+	+
ts PTD 252	-	-	-	-	-	-	+	+
ts PTD 253	-	-	-	-	-	-	+	+
ts TD 201	-	-	-	-	-	-	-	-
ts TD 202	-	-	-	-	-	-	-	-
ts TD 203	-	-	a	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
ts TD 204	-	-	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
ts TD 205	-	-	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.

a nicht getestet

Abbildung 1

Darstellung des Genoms von Rous Sarkom Viren



- ^a gag $\hat{=}$ Gen, welches für die Strukturproteine des Virus kodiert
- ^c env $\hat{=}$ Gen, welches für die Hüllproteine des Virus kodiert
- ^b pol $\hat{=}$ Gen, welches für die Reverse Transkriptase des Virus kodiert
- ^d sarc $\hat{=}$ Gen, welches für das Transformations-spezifische Protein des Virus kodiert

Abbildung 2

Nachweis des "Plasminogen Aktivators" in virus-infizierten Zellen mit Hilfe des "Agar-Casein-Overlay" Tests.



- a) ts TD 2o2 infizierte Zellen bei permissiver und b) bei nicht-permissiver Temperatur
c) ts PTD 253 infizierte Zellen bei permissiver und d) bei nicht-permissiver Temperatur

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1975 bis Oktober 1976 am Institut für Virologie, Fachbereich Humanmedizin, der Justus Liebig-Universität in Giessen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. Bauer danke ich sehr für das Interesse und die vielfältige Unterstützung, die er der vorliegenden Arbeit zukommen ließ. Herrn Professor Dr. R.R. Friis bin ich für seine Anleitung und die zahlreichen Anregungen und Diskussionen während dieser Zeit zu besonderem Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Ich wurde am 25. Juni 1952 als Tochter des Vermessungsingenieurs Eberhard Becker und seiner Frau Hildegard in Göttingen geboren.

Nach dem Realschulabschluß besuchte ich den naturwissenschaftlichen Zweig des Felix-Klein-Gymnasiums in Göttingen, wo ich im Mai 1971 die Abiturprüfung ablegte.

Zu Beginn des Wintersemesters 1971/72 wurde ich an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen für das Fach Biologie immatrikuliert. Zum Sommersemester 1972 wechselte ich zur Freien Universität Berlin über, wo ich im Juni 1973 die Vordiplom-Prüfung bestand. In der Zeit vom 1. August 1973 bis 1. Juli 1974 fertigte ich unter der Leitung von Professor H. Bauer im Robert-Koch-Institut, Abteilung Virologie, in Berlin meine Diplom-Arbeit an. Im Dezember 1974 beendete ich mein Hochschulstudium mit der Diplomprüfung für das Fach Biologie.

Seit 1. Januar 1975 bin ich als Doktorandin für das Fach Tumorstudiologie unter der Leitung von Professor H. Bauer in der Abteilung für Virologie des Bereichs Humanmedizin an der Justus Liebig-Universität in Giessen tätig.

